

特表平6-508029

第1部門第1区分

(43) 公表日 平成6年(1994)9月14日

(51) Int.Cl. <sup>3</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I
C 1 2 N 15/12	Z N A		
A 6 1 K 37/02	A E D	8314-4C	
C 0 7 K 13/00		8318-4H	
C 1 2 N 1/21		7236-4B	
		9050-4B	
		C 1 2 N 15/ 00	A
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 15 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願平5-500204  
 (86) (22) 出願日 平成4年(1992)5月14日  
 (85) 翻訳文提出日 平成5年(1993)11月16日  
 (86) 国際出願番号 P C T / U S 9 2 / 0 4 0 7 3  
 (87) 国際公開番号 W O 9 2 / 2 0 7 9 5  
 (87) 国際公開日 平成4年(1992)11月26日  
 (31) 優先権主張番号 7 0 2 , 7 7 0  
 (32) 優先日 1991年5月17日  
 (33) 優先権主張国 米国 ( U S )  
 (81) 指定国 E P ( A T , B E , C H , D E ,  
 D K , E S , F R , G B , G R , I T , L U , M C , N  
 L , S E ) , A U , C A , J P

(71) 出願人 シタス オンコロジー コーポレイション  
 アメリカ合衆国, カリフォルニア 94608,  
 エメリービル, ホートン ストリート  
 4560  
 (71) 出願人 ザ ユニバーシティ オブ ノース カロ  
 ライナ アット チャペル ヒル  
 アメリカ合衆国, ノースカロライナ, チャ  
 ペル ヒル (番地なし)  
 (72) 発明者 ハスキル, ジョン スティーブン  
 アメリカ合衆国, ノースカロライナ  
 27516, チャペル ヒル, フォックス ラ  
 ン 106  
 (74) 代理人 弁理士 宇井 正一 (外4名)  
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 N F - α B 転写活性化物質のインヒビター及びその使用

## (57) 【要約】

変えられた遺伝子発現、たとえばサイトカイン又は関連する分子をコードする遺伝子に起因する疾病の処理のための予防薬又は治療剤の同定のために適用される組成物及びその使用方法が記載される。

BEST AVAILABLE COPY

## 請求の範囲

1. DNA に結合する NP-<sub>1</sub>B を減じ又は排除する、NP-<sub>1</sub>B に結合するタンパク質をコードする単離されたヌクレオチド配列。
2. 前記配列がDNA 又はRNA を含んで成る請求の範囲第1項記載の単離されたヌクレオチド配列。
3. 前記配列が I、B をコードする請求の範囲第2項記載の単離されたヌクレオチド配列。
4. I、B をコードするcDNA配列。
5. 前記配列が図2に示される配列を含んで成る請求の範囲第4項記載のcDNA配列。
6. 請求の範囲第5項記載のcDNA配列により形質転換された細胞。
7. 請求の範囲第5項記載のcDNA配列を含んで成るベクター。
8. 請求の範囲第5項記載のcDNA配列によりコードされるタンパク質。
9. 組換え I、B。
10. 組換え I、B 及び NP-<sub>1</sub>B を含んで成る複合体。
11. I、B 活性を有するタンパク質をコードするcDNA配列であって、前記cDNA配列が3種のドメインを含んで成り、ここで前記第1ドメインが約72個のアミノ酸の親水性範囲を有し、そしてコンセンサス配列、DEEYEQMVK(配列番号4)を含む前記タンパク質のN-末端をコードし；第2ドメインがアンキリンに存在するコンセンサス配列の5個のタンデム反復体をコードし；そして第3ドメインが第1のRPSTR(配列番号5)及び第2のPEST(配列番号6)のコンセンサス配列を含んで成る前記タンパク質のC-末端配列をコードすることを特徴とするcDNA配列。
12. 遺伝子発現を高める医薬である化学物質を同定するための方

断方法であって、前記個人における I、B の発現が前記疾病を有さないとされる個人に比較して高められるかいつれかを決定することを含んで成る方法。

21. 前記 I、B の発現が I、B、又は I、B mRNAの量を測定することによって決定される請求の範囲第20項記載の方法。

法であって：

- a) 前記化学物質と I、B 及び NP-<sub>1</sub>B を含んで成る複合体とを接触せしめ；そして
- b) 前記複合体を解離するその能力により医薬としての前記化学物質を同定する段階を含んで成る方法。

13. 遺伝子発現を低める医薬である化学物質を同定するための方法であって：

- a) I、B、NP-<sub>1</sub>B 及び前記化学物質を溶液において結合し、ここで前記 I、B 及び NP-<sub>1</sub>B は、I、B 及び NP-<sub>1</sub>B を含んで成る複合体を形成するのに十分な量で存在し；そして前記複合体からの I、B の解離を妨げ又は遅くするその能力により医薬としての前記化学物質を同定する段階を含んで成る方法。

14. 遺伝子過剰発現に起因する疾病を有する動物を処理するための方法であって、請求の範囲第12項記載の医薬の有効量を前記動物に投与することを含んで成る方法。

15. 遺伝子過剰発現に起因する疾病を有する動物を処理するための方法であって、請求の範囲第13項記載の医薬の有効量を前記動物に投与することを含んで成る方法。

16. 請求の範囲第12項記載の方法により同定される医薬。

17. 請求の範囲第13項記載の方法により同定される医薬。

18. 遺伝子過剰発現に起因する疾病を有すると思われる個人の診断方法であって、前記個人における I、B の発現が前記疾病を有さないとされる個人に比較して減じられるかいつれかを決定することを含んで成る方法。

19. 前記 I、B の発現が I、B、又は I、B mRNAの量を測定することによって決定される請求の範囲第18項記載の方法。

20. 遺伝子過剰発現に起因する疾病を有すると思われる個人の診

## 明 細 書

NP-<sub>1</sub>B 転写活性化物質のインヒビター及びその使用

本発明は、分子生物学／生化学の分野に関する。サイトカイン又は抗体の所望しない生成に起因する疾患又はウィルス疾患の処理のための予防薬又は治療法の同定のために適用される組成物が本明細書に記載される。より詳しくは、種々のタンパク質をコードする遺伝子、たとえばサイトカイン又は関連する分子、ウィルスタンパク質及び免疫グロブリンをコードする遺伝子の転写活性をもたらし阻害材料が示される。

サイトカインは、多数の生物学的機能を有する小分子量タンパク質である（この情報については、Balkwill, F.R., など, 1989, Immun. Today, 10:299を参照のこと）。たとえば、サイトカインは、それら自体の合成及び種々の細胞型からの他のサイトカインの生成を刺激できることが知られている。それらはまた、疾病にも関連する。

良好な例は、サイトカインインターロイキン-1 (IL-1) 及び腫瘍壊死因子 (TNF) の存在である。IL-1は、複数の生物学的活性を有することが示されており、ここで熱発生及びリンパ球活性化が特に目立っている。さらに、両サイトカインは、単独で又は組合して、細菌感染により引き起こされるヒトにおける敗血症ショックの血流力学的及び血液学的特徴である、動物におけるショック状態を引き起こす。さらに、TNF は、潜在性ウィルスを担持するヒト細胞におけるヒト免疫欠損ウィルスの発現を開始せしめることにおいて関与することが最近示されている。Folkなど, 1989, PNAS(USA), 86: 2365. TNF 及びIL-1はまた、種々の自己免疫疾患、特に関節炎においても役割を じる。Duff, など, 1987, International Conference

on Tumor Necrosis Factor and Related Cytokines, 175: 10.

IL-1及びTNFの他に、他のサイトカイン、すなわちIL-6が、感染、特に敗血症、及び腫瘍細胞の増殖への影響に関与することが最近示された。Hack, など, 1989, *Blood*, 74:1704;及びMikiなど, 1989, *FEBS*, 250:607. IL-6はまた、ハイブリドーマ増殖因子、インターフェロン- $\beta$ -2、B-細胞刺激因子2、26kDのタンパク質及び肝細胞刺激因子とも称される。

適切な下層への付着が、マクロファージ又は単球により生成される炎症のサイトカイン中間体の転写発現において重要であることが示されており、そして異なったマトリックスへの付着は好ましい遺伝子誘発をもたらすことが示されている (Sporn, S. A., など, 1990, *J. of Immunol.*, 144:4434 ~ 4441; Thorens, B., など, 1987, *Cell*, 48:671)。たとえば、プラスチックへの単球付着の30分以内で、調節出来事の複雑な組が、いくつかの炎症性中間体及びプロト-癌遺伝子のmRNAレベルの急速な変化により定義されるように、開始せしめられる (Haskill, S., など, 1988, *J. of Immunol.*, 140:1690)。IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 及びc-fosは急速に高められるが、ところがCSF-1は定常状態のmRNAレベルは90分までに高まる。対照的に、c-fms及びリゾチームの発現は急速にダウンレギュレートされる。それらの遺伝子は、生物学的に関連する種々の支持体への付着により変性される (Eierman, D. F., 1989, *J. of Immunol.*, 142:1970 ~ 1970)。

炎症の高い定常状態のmRNAレベルの重要な中間体は付着により急速に誘発されるが、付着自体は、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 又はCSF-1の効果的な翻訳及び分泌を引き起こすために不十分である (Haskill, S., など, 前記)。第2シグナル、たとえば細菌エンドトキシンによる活性化が、すべての3種の遺伝子生成物の分泌のために必要とされる。従って、付着の作用に由来するシグナルが感染にตอบสนองし、そして局

部組織環境に影響を及ぼすことを可能にする単球の活性化及び分化に有意な役割をたふん演ずることは明白である (Sporn, S. A., 前記)。

最近、NF- $\kappa$ Bと称するタンパク質は転写活性化物質であることが示された (Son, R. and Baltimore, D., 1986, *Cell*, 46:705 ~ 716)。この因子は、あるサイトカイン遺伝子のDNA調節領域に結合することが示されている (Leonardo, M. and Baltimore, D., 1989, *Cell*, 58:227 ~ 229)。種々の遺伝子が核NF- $\kappa$ B DNA-結合活性の誘発を引き起こす (Son and Baltimore, 前記)。従って、NF- $\kappa$ Bは、種々のサイトカイン遺伝子のための遺伝子発現の転写調節であると思われる。従って、NF- $\kappa$ Bの効果を増強する分子を同定することが所望される。なぜならば、それらは炎症応答においてサイトカインの効果を増強するのに有用であるからである。

NF- $\kappa$ BはI、Bと称する36kDのタンパク質に関連していることが最近示された (Baerle, P. and Baltimore, D., 1988, *Cell*, 53:211 ~ 217; Baerle, P. and Baltimore, D., 1988, *Science*, 242:540 ~ 546)。NF- $\kappa$ Bは、50及び65kDの分子量を有するタンパク質から成る。I、Bは65kDのサブユニットに結合する (Baerle, P. and Baltimore, D., 1989, *Genes and Development*, 3:1689 ~ 1698)。最後に、最近の実験的出来事が、I、Bのリン酸化がNF- $\kappa$ BのDNA結合活性に対してその阻害効果をブロックすることを示す。これは、タンパク質キナーゼがNF- $\kappa$ B DNA結合活性をインビトロで活性化する観察と一致する (Ghosh, S. and Baltimore, D., 1990, *Nature*, 344:678 ~ 682)。

遺伝子発現を調節することにおけるI、Bの重要性のために、この分子の精製、クローニング及び発現は、有意な医学的用途を有するであろう。NF- $\kappa$ B及びI、Bの調節体の同定のためのアッセイを利用性にするであろうことが明らかであろう。

本明細書に記載される本発明の1つの観点は、34 ~ 38kDの分子量を有するNF- $\kappa$ Bにより転写活性化を阻害するタンパク質の記載から成る。

本発明の第2の観点は、34 ~ 36kDの分子量を有するNF- $\kappa$ Bにより転写活性化を阻害するタンパク質をコードするcDNA配列の記載である。

本発明の第3の観点は、34kDの転写活性化インヒビターのクローニング及び発現方法の記載である。

本発明の第4の観点は、所望しない遺伝子発現に起因する疾病の制御のために有用であるI、Bを用いての薬剤の同定方法である。

本発明の第5の観点は、I、Bの効果を増強するそれらの能力により免疫応答を高める薬剤の同定方法である。

本発明の第6の観点は、前記I、Bに類似する性質を有する転写活性化物質インヒビターの同定、及び所望しない遺伝子発現に起因する疾病の処理に有用である薬剤を同定するためにそのようなインヒビターを用いる方法である。

本発明の第7の観点は、I、B発現の機能として疾病を検出するための診断方法の記載である。

本発明のそれらの及び他の観点は、下記本発明の完全な考慮に基づいてより十分に理解されるようになるであろう。

図1はMAD-3のcDNA配列を示す。

図2はI、BのcDNA配列及びそれに基づく推定されるタンパク質配列を示す。1.6kbの大きさのクローンは、ノーザンブロット分析に基づいての転写体サイズから推定される大きさに近い。コンセンサスチロシンリン酸化部位及び可能なPI-3キナーゼ結合ドメインは下線が引かれており、推定されるPKCリン酸化部位は、上線が引かれており、そして3種のATTA (配列番号1) モチーフは下線が引か

れており、そして濃く書かれている。アンキリン反復体ドメイン (Lux など, 1990, *Nature*, 144:36 ~ 42) は、濃く示されている。

図3はKyte-Doolittle親水性/疎水性プロットを示す。5種のアンキリン反復体は上線が引かれており、そして個々の反復体は印が付けられている。推定されるPI-3キナーゼ結合ドメイン及び推定上のPKCキナーゼ標的配列もまた上線が引かれている。

図4Aは、インビトロ転写されたI、B mRNAがI、Bの性質を有する36 ~ 38kDのタンパク質を翻訳することを示す。10% SDSポリアクリルアミドゲル分析の網状赤血球溶解物は、インビトロ転写されたI、B mRNA (レーン1、WT) 又はAccI消化されたプラスミドから転写されたI、B mRNA (レーン2、 $\Delta$ ) をプログラムした。タンパク質は、<sup>35</sup>S-メチオニンによりラベルされた。予備染色された分子量マーカーの移動度が示される。

図4Bは、プログラムされた網状赤血球溶解物、及びPMA及びPHA処理されたJurkat T-細胞の核抽出物を分析するゲル移動度シフトを示す。すべてのレーンのために、クラスI MHCエンハンサープローブが使用された。次のタンパク質源が使用された：刺激されたJurkat T-細胞の核抽出物 (レーン1)、Jurkat抽出物+I、Bプログラムされた溶解物 (レーン2、WT)、Jurkat抽出物+AccI-欠失構造体からのmRNAにより翻訳された溶解物 (レーン3、 $\Delta$ )、及びJurkat抽出物+擬似翻訳された網状赤血球溶解物のみ (レーン5、WT)。大きな矢印はNF- $\kappa$ B/DNA複合体の移動度を示し、そして小さな矢印はKBPI/DNA複合体の移動度を示す。

図4Cは、刺激されたJurkat T-細胞の核抽出物を特徴化するゲル移動度シフトアッセイを示す。次のタンパク質源が使用された：刺激されたJurkat T-細胞の抽出物 (レーン1 ~ 5)、+NF- $\kappa$ Bのp50 DNA-結合サブユニットに対する抗血清 (レーン4、Iは免

疫抗血清を示す)又はブレイ免疫(P)抗体(レーン5)。DNAプローブは、図の上部に示される通りである: MUT (MHC二点変異プローブ)、IgK(免疫グロブリンカッパ)及びMHC(クラスIのMHCエンハンサープローブ)。大きな矢印は NF- $\kappa$ B / DNA 複合体の移動度を示し、そして小さな矢印は KBP1 / DNA 複合体の移動度を示す。

図5Aは I, B タンパク質による DNA-結合活性の阻害の特異性を示す。ゲル移動度シフトは、種々の DNA-結合活性を分析する。アデノウィルス MLTF 及び Oct-1 (OCTA) プローブ (示されるような)が、刺激された Jurkat T-細胞の核抽出物 (レーン1~3) + I, B プログラムされて溶解物 (レーン2, WT)、又は + 擬似翻訳溶解物 (レーン3, MT) と共にインキュベートされた。クラス I MHCエンハンサープローブが、DNA-結合活性 H2TF1 (Baldwin and Sharp, 1987, *Mol. Cell. Biol.*, 7:305~313) を含む HeLa 細胞からのホスホセルロース画分 (レーン1)、+ I, B プログラムされた溶解物 (レーン2) 又は + 擬似翻訳された溶解物 (レーン3, MT) と共にインキュベートされた。

図5Bは、単球の核抽出物における NF- $\kappa$ B を分析するゲル移動度シフトを示す。クラス I MHCエンハンサーが、新たに単離された単球の核抽出物と共にインキュベートされた (レーン1)、レーン2は、擬似翻訳された溶解物の添加を含む (MT)、そしてレーン3は I, B 翻訳された溶解物の添加を含む (WT)。大きな矢印は、NF- $\kappa$ B / DNA 複合体の移動度を示し、そして小さな矢印は KBP1 / DNA 複合体の移動度を示す。

図6は、デオキシコレートが、I, B 阻害からの NF- $\kappa$ B DNA-結合活性を放すことを示す。ゲル移動度シフトは、次の結合条件を伴ってクラス I MHCエンハンサープローブを用いる: DNA-親和性精製された NF- $\kappa$ B (レーン1~3)、+ I, B プログラムされた

溶解物 (レーン2及び3)。I, B プログラムされた抽出物と共に精製された NF- $\kappa$ B をインキュベートした後、DOC 続いて NP40 を添加した (レーン4)。矢印は、NF- $\kappa$ B / DNA 複合体の移動度を示す。

図7Aは、I, B mRNA発現の誘発の運動学、基質特異性及び組織分布を示す。非付着技法により単離された単球は、タイプIVコラーゲン被覆プレート上にプレートされ、そしてRNAが指摘される時点で付着性細胞から抽出され、そしてプローブとして元の I, B cDNA クローン挿入体を用いてノーザントランスファー分析により分析された (Sporn *など*, 1990)。分析される時間は、新たに単離された単球 (To)、タイプIVコラーゲン被覆プレートへの30分 (30') 及び1, 2, 4 及び8時間の後-付着であった。RNAのレベルは、臭化エチジウム-染色された18及び28 RNAバンドの強さを比較することによって標準化された。

図7Bは、タイプIVコラーゲン、フィブロネクチン、抗-フィブロネクチンにより複合体化されたフィブロネクチン (Eierman *など*, 1989) により前処理された又は被覆されていないプラスチック皿上にプレートされた単球を示す。RNAが、4時間で抽出され、そして I, B プローブを用いてノーザンプロットにより分析された。子宮内膜由来の炎症性腹膜マクロファージからのRNA及び新たに単離された好中球 (PMN) がまた分析された。

図7Cは、単球からのRNAを示し、そして種々の細胞系が I, B mRNAの構成及び誘発レベルを決定するために、半定量PCR技法によつて分析された。RNAサンプルは、LPSによる4時間の刺激を伴って又は伴わないでのヒトヘソ静脈内皮 (HUVE); HeLa (癌)、RAJ1 (B-細胞)、HSB (T-細胞) 又は S68 (多形性腫瘍) 細胞を包含した。連続的に希釈された4時間付着された単球cDNAが定量目的のため

めに使用された。比較のために、新たな単球及び4時間、付着された単球のcDNAが NF- $\kappa$ B 転写体の発現について試験された。

ここに記載される発明は、以前公開された研究及び継続特許出願に基づく。そのような研究は、科学雑誌、特許又は継続特許出願から成る。すべてのそれらの出願及び出版物は、引用により本明細書に組込まれる。

本発明は、特定因子、たとえば NF- $\kappa$ B 転写活性化物質インヒビター因子又は I, B の単離、同定、クローニング及び発現に関する。前記インヒビターは、その分子及び化学的性質に関して特徴づけられた。それらの個々は下記に別々に論ぜられるであろう。

本発明の I, B インヒビターを論ずる前、本明細書に記載されるインヒビターは、定義された化学構造を有するタンパク質性物質から成ることを気づくことは重要である。しかしながら、そのインヒビターの正確な構造は、多くの要因、特にタンパク質に生じることが知られている化学的変法に依存する。たとえば、すべてのタンパク質はイオン化できるアミノ及びカルボキシル基を含むので、もちろん、インヒビターは酸性又は塩基性塩の形、又は中性形で得られることは明らかである。一次アミノ酸配列は、糖分子を用いての誘導体化 (グリコシル化) により、又はたとえば脂質、ホスフェート、アセチル基及び同様のものによるインヒビターへの共有又はイオン結合を包含する他の化学的誘導体化により増大され得ることがまた明らかである。それらの変性はインビトロ又はインビボで生じ、ここで後者は、後-翻訳処理システムを通して宿主細胞により実施される。そのような変性は、それらがいかんして生じることにかかわらず、下記に定義されるようにタンパク質の活性が破壊されない限り、I, B インヒビターの定義内で生じる予定であることが理解されるであろう。もちろん、そのような変性は分子の生物学的活性を量又

は質的に高め又は低め、そしてそのような化学的に変性された分子はまた、本発明の範囲内にいることが予測されるべきである。

“細胞”又は“組換え宿主”又は“宿主細胞”は、内容から明らかなように、交換可能にしばしば使用される。それらの用語は、対象細胞及びもちろんそれらの子孫を包含する。すべての子孫は、環境において変異又は差異が生じるので、親細胞と正確に同一であるとは限らないことが理解される。

本明細書に使用される場合、宿主細胞培養の記載における用語“形質転換された”とは、天然のタンパク質の活性を有する異種タンパク質を生成するために遺伝的に構築されている細胞を示す。形質転換された細胞の例は、本出願の例に記載される。細菌は、タンパク質の生成のための好ましい微生物である。合成タンパク質はまた、適切な形質転換された酵母及び哺乳類宿主細胞により製造され得る。

“操作可能に結合される”とは、成分の正常な機能が実施され得るような並置を言及する。従って、配列を制御するために“操作可能に結合された”コード配列は、そのコード配列がそれらの配列の制御下で発現され得る形状を言及する。

“制御配列”とは、特定の宿主生物において操作可能に結合されたコード配列の発現のために必要なDNA配列を言及する。原核生物のために適切である制御配列は、プロモーター、任意にはオペレーター配列、リボソーム結合部位及びたぶん、まだ十分には理解されていない他の配列を包含する。真核細胞は、プロモーター、ポリAデニル化シグナル及びエンハンサーを利用することが知られている。

“発現システム”とは、所望するコード配列及び制御配列を操作可能に結合を含むDNA配列を言及し、その結果、それらの配列によ

り形質転換された宿主は前記コードされたベクターを生成することができる。形質転換をもたらすためには、発現システムはベクター上に包含されるが、しかしながら次に、適切なDNA がまた、宿主染色体中に組込まれ得る。

本明細書に使用される場合、用語“医薬的に許容できる”とは、活性成分の生物学的活性の有効性を妨害せず、そしてそれが投与される宿主に対して毒性ではないキャリアー媒体を言及する。投与は、いずれか適切な技法、たとえば皮下及び非経口投与により生じ、好ましくは非経口投与である。非経口投与の例は、静脈内、動脈内、筋肉内及び腹腔内であり、そして静脈内投与が好ましい。

最後に、インヒビター 1、8 の活性は炎症応答又はウイルス感染に包含される遺伝子の発現に基づいて NF- $\kappa$ B の転写活性を調節するために適用されるように論じられて来たが、阻害活性の範囲は、炎症又はウイルス感染に包含されない多くの細胞系における NF- $\kappa$ B の存在により示されるように広いことを注目することは重要である。従って、それらの遺伝子の発現に関しては、1、8 は、インヒビター又はそれらの発現の刺激体を同定するために有用であると推定される。

切断されたサイトカインインヒビターをコードするcDNA配列を含むcDNAライブラリー、そのcDNA配列の同定、及びその配列のサブクローニング及び発現の確立は、当業者に知られている多くの方法を用いる。使用される方法及び材料の一般的な記載は、読者の便利さのために本明細書に示される。より特定には、所望するサイトカインコード配列を含む適切なベクターの構成は標準の連結及び制限方法を使用し、ここで単離されたベクター、DNA 配列又は合成されたオリゴヌクレオチドが切断され、処理され、そして所望する形に再連結される。

連結は、次の標準条件及び温度下で15~30 $\mu$ lの体積において行なわれる：20mMのトリス-CI、pH7.5、10mMのMgCl<sub>2</sub>、10mMのDTT、33 $\mu$ g/mlのBSA、10mM~50mMのNaCl、及び1mMのATP、及び“付着端”連結のためには、14°Cでの0.3~0.6(Weiss)単位のT4 DNAリガーゼ、又は“プラント端”連結のためには1mAのATP及び0.3~0.6(Weiss)単位のT4リガーゼが使用された。分子間“付着端”連結は通常、33~100 $\mu$ g/mlの合計DNA濃度で行なわれる。プラント端連結においては、前記端の合計DNA濃度が約1 $\mu$ Mである。

“ベクターフラグメント”を用いてのベクター構成において、そのベクターフラグメントは、5'ホスフェートを除去し、そしてベクターの再連結を防ぐために細菌アルカリホスファターゼ(BAP)により通常処理される。BAP消化は、ベクター1 $\mu$ g当たり約1単位のBAPを用いて、Na<sup>+</sup>及びMg<sup>++</sup>の存在下で、約150mMのトリスにおいてpH8で約1時間、60°Cで行なわれる。核酸フラグメントは、フェノール/クロロホルムにより調製物を抽出し、次にエタノール沈殿により回収される。他方、再連結は、所望しないフラグメントの追加の制限酵素消化により二重消化されたベクターにおいては防止され得る。

下記に示される構成においては、正しい連結が、まず、適切なE. コリ株を連結混合物により形質転換することによって確保される。適切な形質転換体は、当業界において理解されるように、アンピシリン、テトラサイクリン又は他の抗生物質に対する耐性により、又はプラスミド構成の態様に依存して他のマーカーを用いることによって選択される。Miniprep DNAを、D. Ish-Horowitzなど、1981, Nucleic Acids Res., 9:2989の方法により形質転換体から調製し、そして制限により分析し、そして/又はMessingなど、1981,

部位特異的DNA切断、一般的に当業界において理解されている及び特に、市販の制限酵素の製造業者により記載されている条件下で適切な制限酵素により処理することによって行なわれる。たとえば、New England Biolabs, Product Catalogを参照せよ。一般的に、プラスミド又はDNA配列1 $\mu$ gが約20 $\mu$ lの緩衝溶液中、1単位の酵素により切断される。本明細書における例においては、典型的には、過剰の制限酵素が、DNA基質の完全な消化を確保するために使用される。約37°Cでの約1時間~2時間のインキュベーション時間を用いられるが、但し種々の変動が実施され得る。個々のインキュベーションの後、タンパク質はフェノール/クロロホルムによる抽出により除去され、そしてエーテル抽出が伴ない、そして核酸が、エタノールによる沈殿、続くSephadex G-50 スピニングカラムを用いてのクロマトグラフィー処理により水性画分から回収される。所望には、切断されたフラグメントのサイズ分離が、標準の技法を用いて、ポリアクリルアミドゲル又はアガロースゲル電気泳動により実施され得る。サイズ分離の一般的な説明は、Methods in Enzymology, 1980, 65:499~560に見出される。

制限切断されたフラグメントは、50mMのトリス、pH7.6、50mMのNaCl、6mMのMgCl<sub>2</sub>、6mMのDTT及び10mMのdNTPにおいて20~25°Cで約15~25分間のインキュベーション時間を用いて、4種のデオキシヌクレオチドトリホスフェート(dNTP)の存在下で、E. コリDNAポリメラーゼIの大きなフラグメント、すなわちクレノウフラグメントにより処理することによりプラント末端化され得る。クレノウによる処理の後、その混合物はフェノール/クロロホルムにより抽出され、そしてエタノール沈殿せしめられる。適切な条件下でS1ヌクレアーゼによる処理は、一本鎖部分の加水分解をもたらす。

Nucleic Acids Res., 9:309により記載されているようにして、P. Sangerなど、1977, PNAS(USA), 74:5463のデオキシ方法により又はMaxamなど、1980, Methods in Enzymology, 65:499の方法により配列決定することができる。

MBにおけるクローニングに使用される宿主株は、ファージ感染に対して敏感なE. コリ株から成り、たとえばE. コリK12株DG98が使用される。そのDG98株は1984年7月13日ATCCに寄託されており、そして受託番号第1965を有する。

使用される宿主細胞に依存して、形質転換は、そのような細胞に適切な標準技法を用いて行なわれる。Cohen, S.N.など、1972, PNAS(USA), 69:2110により記載されるようにして、塩化カルシウムを用いるカルシウム処理及びHanahan, D., 1983, J. Mol. Biol., 166:557~580により記載されるような変性が、実質的な細胞壁バリアーを含む原核生物又は他の細胞のために使用される。アグロバクテリウム ツメファシエンシス (*Agrobacterium tumefaciens*)による感染(Shawなど、1983, Gene, 23:315)が一定の植物細胞のために使用される。酵母の形質転換は、Van Solingenなど、1977, J. Bacterial, 130:946及びHsiaoなど、1979, PNAS(USA), 76:3829の方法に従って行なわれる。

いくつかのトランスフェクション技法が、そのような細胞壁を有さない哺乳類のために利用できる。Graham and van der Eb, 1978, Virology, 52:546のリン酸カルシウム沈殿法は1つの方法である。トランスフェクションは、リン酸カルシウム同時沈殿技法の変法(Wangなど、1985, Science, 228:149)を用いて行なわれる。もう1つのトランスフェクション技法は、DEAE-デキストランの使用を包含する(Sompayrac, L.M.など、1981, PNAS(USA), 78:7575~7578)。他方、リポフェクションは、宿主細胞中にプラスミドDNA

を輸送するために脂質マトリックスを用いたインスフェクション法を普及する。リポフェクション試薬として普及される脂質マトリックスはBRLから入手できる。

合成オリゴヌクレオチドは、Matteucci など、1981、J. Am. Chem. Soc. 103:3185のトリエステル法により、又は市販の自動オリゴヌクレオチド合成機を用いて調製される。アニーリングの前又はラベリングのための一本鎖のキナーゼ処理は、50mMのトリス、pH7.6、10mMのMgCl<sub>2</sub>、5mMのジチオトレイトール、1~2mMのATP、1.7pモルの<sup>32</sup>P-ATP(2.9mCi/mモル)、0.1mMのスペルミジン、0.1mMのEDTAの存在下で、0.1mモルの基質に対して過剰の、たとえば約10単位のポリヌクレオチドキナーゼを用いて達成される。

特定の核酸配列は、1987年7月28日に公開されたアメリカ特許第4,683,195号、1987年7月28日に公開されたアメリカ特許第4,683,202号及び1989年1月24日に公開されたアメリカ特許第4,800,159号(後者は引用により本明細書に組込まれる)に開示されているような一般方法に従って、それらの非-相補的端上に制限部位を含む配列を増幅するためにプライマーを用いることによってベクター中にクローン化され得る。熱安定性サーマス アクアチカス (*Thermus aquaticus*)(Taq)DNAポリメラーゼの使用を包含するこの方法の変法は、1988年3月2日に公開されたヨーロッパ特許出願第258,017号(これは、引用により本明細書に組込まれる)に記載されており、そして特許づけられている。1987年9月9日に公開されたヨーロッパ特許出願第236,069号(これは、引用により本明細書に組込まれる)に記載されているThermal Cycler装置(Perkin-Elmer-Cetus)もまた有用である。

一般的に、クローン化される核酸配列は個々の鎖のために1つのオリゴヌクレオチドプライマーにより処理され、そして個々の核酸

鎖に対して相補的である。プライマーの拡張生成物が合成される。ポリメラーゼ鎖反応(この後、PCRとして言及される)のための鎖型として対象のリンホカインをコードするプラスミドDNAの使用の選択は、アメリカ特許第4,800,159号に記載されるようなPCRのための鎖型としてそれらのリンホカインを生成するいくつかの細胞からのRNAの使用である。RNAが利用できる出発材料である場合、その精体から分離される場合に1つのプライマーから合成される拡張生成物が、他のプライマーの拡張生成物の合成のための鎖型として作用することができる。前で言及されたように、個々のプライマーは、他のプライマー上の制限部位と同じであるか又は異なっているその5'端上に制限部位を含む。十分な増幅が生じた後、その増幅生成物は、制限消化物における切断された生成物を得るために適切な制限酵素により処理される。クローン化される所望のフラグメントが次に単離され、そして適切なクローニングベクター中に連結される。

1. B cDNA、又は配列変性を必要とするゲノムDNAに由来するベクターの部分のためには、部位特異的プライマー指図の変異誘発が使用される。この技法は、現在、当業界において標準であり、そして変異誘発される一本鎖ファージDNAに相補的なプライマー-合成オリゴヌクレオチドを用いて行なわれる(但し、制限されたミスマッチングのためには、所望する変異誘発をくり返す)。手短に言えば、合成オリゴヌクレオチドがファージに対して相補的な鎖の合成を指図するプライマーとして使用され、そして得られる二本鎖DNAがファージ支持の宿主細胞を形質転換する。形質転換された細胞の培養物が、寒天上に置かれ、ファージを有する単一の細胞からのブランク形成が可能にされる。

理論的には、50%の新規ブランクは、一本鎖として、変異誘発さ

れた形を有するファージを含み;他の50%は元の配列を有するであろう。ブランクは、ニトロセルロースフィルターに移され、そして“持ち上げられたもの(lifts)”が、正確なマッチのハイブリダイゼーションを可能にするが、しかし、元の鎖とのミスマッチが、ハイブリダイゼーションを妨げるのに十分である温度で、キナーゼ処理された合成プライマーによりハイブリダイズされる。次に、プローブとハイブリダイズするブランクが取り出され、そして培養され、そしてそのDNAが回収される。部位特異的変異誘発法の詳細は、下記特定の例に記載されている。

下記に示される構成においては、プラスミド構成のための正しい連結は、E. コリ株MM294又は他の適切な宿主を連結混合物によりまず形質転換することによって確保される。適切な形質転換体が、当業界において理解されるように、アンピシリン、テトラサイクリン又は他の抗生物質耐性により又はプラスミド構成の態様に依存して、他のマーカーを用いて選択される。形質転換体のさらなるスクリーニングは、Maniatis, T. など、(前記:312-328)に記載されるようにしてコロニーハイブリダイゼーションの技法を用いて可能である。手短に言及すれば、コロニーがニトロセルロースフィルター上に持ち上げられ、そして次の溶液の1つによりそれぞれ約5分間個々に飽和された4種のWhatman フィルターの個々に連続的に配置される:(1)10% SDS;(2)0.5MのNaOH/1MのNaCl;(3)1.5MのNaCl、1.5Mのトリス、pH8.0;(4)2×SSC。細胞溶解及びDNAの結合の後、フィルターは、30%ホルムアミドを含むハイブリダイゼーション緩衝液において42℃で0.5~1時間、プレハイブリダイズされ、続いて4℃で1~2時間、ハイブリダイズされる。フィルターは2×SSC及び0.1% SDSにより3度洗浄され、バックグラウンドが低じられる。

次に、形質転換体からのプラスミドが、Clewell など、1969、PNAS(USA) 62:1159の方法に従って、場合によっては、クロラムフェニコール増幅(Clewell, 1972, J. Bacterial 110:667)に続いて調製される。単離されたDNAは、制限により分析され、そして/又はMessing など、1981, Nucleic Acids Res. 9:309によりさらに記載されているようにしてSanger など、1977, PNAS(USA), 74:5463のジデオキシ法により、又はMaxam など、1980, Methods in Enzymology 65:499の方法により配列決定される。

1. B インヒビターをコードするDNAの発現は、広範囲の種類の細胞タイプにおいて実施され得る。最っとも頻繁には、原核生物が、E. コリの種々の株により表わされる。しかしながら、他の微生物株、たとえばバシラス(bacillus)、たとえばバシラス サブチリス(*Bacillus subtilis*)、種々の種のプソイドモナス(*Pseudomonas*)又は他の細菌株がまた、使用され得る。そのような原核系においては、宿主と適合できる種に由来する複製部位及び制御配列を含むプラスミドベクターが使用される。たとえば、E. コリは典型的には、Bolivar など、1977, Gene 2:95により、E. コリ種に由来するプラスミド、すなわちpBR322の誘導体を用いて形質転換される。pBR322はアンピシリン及びテトラサイクリン耐性のための遺伝子を含み、そして従って、所望するベクターの構成において保持され得るか又は破壊され得るかいつれかである追加のマーカーを提供する。転写開始のためのプロモーター、場合によってはオペレーター、並びにリボソーム結合部位を含むように本明細書において定義される通常使用される原核制御配列は、β-ラクタマーゼ(ペニシリナーゼ)及びラクトース(*lac*)プロモーター系(Chang など、1977, Nature 198:1056)、トリプトファン(*trp*)プロモーター系(Goeddel など、1980, Nucleic Acids Res. 8:4057)及び乳糖誘導

P、プロモーター (Shimatake など、1980、*Nature* 292:128) のような通常使用されるプロモーター、及び1987年12月8日に公開されたアメリカ特許第 4,711,845号 (引用により本明細書に組込まれる) に開示されるようにポータブル制御カセットとして有用にされ、そしてN... 配列の6bp 3' 内での切断を可能にする少なくとも1つの制御部位を有する第3 DNA配列の上流のN... に対応する第2 DNA配列に操作可能に結合されるP、プロモーターである第1 DNA配列を含んで成る、N-遺伝子リボソーム結合部位を包含する。1987年5月19日に公開されたアメリカ特許第 4,666,848号 (引用により本明細書に組込まれる) は、増幅された発現能力を有する追加のベクターを開示する。1986年10月8日に公開され、引用により本明細書に組込まれる、Chang などのヨーロッパ特許出願第 196,864号に記載されるホスファターゼA (phoA) システムもまた有用である。しかしながら、原核生物に適合できるいずれの利用可能なプロモーター系でも使用され得る。

細菌の他に、真核微生物、たとえば酵母がまた宿主として使用され得る。サッカロミセス セレビシアエ (*Saccharomyces cerevisiae*) の実験株、すなわちBaker's 酵母が最も使用されるが、但し多くの他の株も通常利用できる。複製の2 $\mu$ 起原を用いるベクターが例示される (Broach, 1983, *Meth. Enz.* 101:307; アメリカ特許第 4,803,164号、引用により本明細書に組込まれる)、酵母発現のために適切な他のプラスミドベクターもまた知られている (たとえば Siinchcomb など、1979, *Nature* 282:39; Tschempe など、1980, *Gene* 10:157及びClarke など、1983, *Meth. Enz.* 101:300)。酵母ベクターのための制御配列は、解糖酵素の合成のためのプロモーターを含む (Hess など、1968, *J. Adv. Enzyme Res.* 7:149; Holland など、1978, *Biochemistry* 17:4900)。

常、哺乳類細胞と適合できるプロモーター及び制御配列、たとえば通常使用されるSimianウィルス40 (SV40) からの初期及び後期プロモーター (Fiers など、1978, *Nature* 273:113)、ウィルスプロモーター、たとえばポリオーマ、アデノウィルス2、ウシ乳頭腫ウィルス又は鳥類肉腫ウィルス由来のプロモーター、又は免疫グロブリンプロモーター及び熱ショックプロモーターを包含する。ベクターとしてBPVを用いて哺乳類系でのDNAの発現のためのシステムは、アメリカ特許第 4,419,446号 (引用により本明細書に組込まれる) に開示される。このシステムの変性は、アメリカ特許第 4,601,978号 (引用により本明細書に組込まれる) に記載される。哺乳類細胞宿主システム形質転換の一般的な観点、1983年8月16日に公開されたアメリカ特許第 4,399,216号 (Axelによる) により記載されている。"エンハンサー" 領域が発現を最適化することにおいて重要であると思われる; 一般的に、プロモーター領域の上流に見出される配列が存在する。複製の起点が、必要とされる場合、ウィルス源から得られる。しかしながら、染色体への組込みは、真核生物におけるDNA複製のためには通常の機構である。

植物細胞もまた宿主として現在使用され得、そして植物細胞と適合できる制御配列、たとえばノバリンシンターゼプロモーター及びポリアデニル化シグナル配列 (Depicker など、1982, *J. Mol. Appl. Gen.* 1:561) が利用できる。さらに、植物細胞の形質転換のための方法及びベクターが、1985年11月7日に公開されたPCT 出願第 W085/04899号 (引用により本明細書に組込む) に開示されている。

組換え構造体のクローニング、発現及び配列決定に典型的に使用される宿主株は次の通りである。ほとんどの細菌プロモーターの制御下での構造体のクローニング、配列決定及び発現のためには、E. コリGenetic Stock Center GCSC#6135から得られたE. コリ株JM294

酵母宿主微生物におもって有用であり、そして当業界において知られている追加のプロモーターは、3-ホスホグリセレートキナーゼのためのプロモーター (Hitzeman など、1980, *J. Biol. Chem.* 255:2073)、及び他の解糖酵素、たとえばグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ビルベートデカルボキシラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、グルコース-6-リン酸イソメラーゼ、3-ホスホグリセレートムターゼ、ビルベートキナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼ、及びクルコキナーゼのためのプロモーターを包含する。増殖条件により制御される転写の追加の利点を有する他のプロモーターは、アルコールデヒドロゲナーゼ2、イソシクロムC、酸ホスファターゼ、窒素代謝に関連する分解酵素及びマルトース及びガラクトース利用のために応答できる酵素のためのプロモーター領域である (Holland, 前記)。

ターミネーター配列はコード配列の3' 端で所望されると思われる。そのようなターミネーターは、酵母由来の遺伝子において、コード配列の次の3' 末翻訳領域に見出される。例示されるベクターの多くは、プラスミドpeno-46を含むエノラーゼ遺伝子 (Holland など、1981, *J. Biol. Chem.* 256:1385) 又はYEpl3 から得られたLEU2遺伝子 (Broach など、1978, *Gene* 8:121) に由来する制御配列を含む; しかしながら、酵母適合プロモーター、複製の起点及び他の制御配列を含むいずれかのベクターでも適切である。

多細胞生物に由来する真核宿主細胞培養物に I, B を発現することは可能である。たとえば、*Tissue Culture*, Academic Press, Cruz and Patterson, 出版者(1973)を参照のこと。有用な宿主細胞系は、ネズミ骨髄腫NS1, VERO 及びHeLa細胞及びChinese ハムスター卵巣 (CHO) 細胞を包含する。そのような細胞のための発現ベクターは通

が宿主として使用され得る。P, N... プロモーターの制御下での発現のためには、ATCCに寄託されている株、E. コリ株K12MC1000 $\lambda$ 、溶原体、N<sub>1</sub>N<sub>1</sub>c1857SusP...が使用され得る。1987年4月7日に寄託されたE. コリDG116(ATCC53606)がまた使用され得る。

MBファージ組換え体のためには、ファージ感染に対して敏感なE. コリ株、たとえばE. コリK12 株DG98が使用される。DG98株は、1984年7月13日にATCCに寄託されている (ATCC第 39768号)。

哺乳類発現は、COS-A2細胞において達成され、そしてまた、COS-7及びCV-1 (ハムスター及びネズミ細胞) においても達成され得る。昆虫細胞に基づく発現は、スポドプテラ フルギペルダ (*Spodoptera frugiperda*) において存在できる。

I, B インヒビターをコードする十分な長さのcDNA配列が、当業界において知られている分子生物学技法を用いて得られる (但し、注意すべき例外が下記に詳細される)。

いくつかの方法が、相当するcDNA配列を同定するために利用できる。好ましい方法は、付着性単球から単離されるRNAを用いてライブラリーを生成することであるが、しかしライブラリーはインヒビターを発現する生物学的材料の實質的にいくつかの源から生成され得; 実際、cDNAライブラリーは市販されている。単球は、適切な表面への付着性が I, B インヒビターの発現を誘発するので、好ましい出発材料である。

インヒビター配列を含むcDNAライブラリーを製造するための例示的な方法は、適切な出発材料から合計の細胞質RNAを単離し、そしてそれからmRNAをさらに単離することから成る。後者は、ポリ (A+) mRNAにさらに分別され、それは次に、サイトカインインヒビターmRNAを含むポリ (A+) mRNA画分にさらに分別され得る。次に、mRNAが逆転写され、そして適切なベクター中にクローン化され、

cDNAライブラリーが形成され得る。

より詳しくは、出発材料、(すなわち組織、細胞)がリン酸緩衝液及び非イオン性界面活性剤、たとえば酸化エチレンにより洗浄され、ポリマータイプ(NP40)が細胞を溶解するが、しかし核膜は溶解しない量で、一般的には約0.3%の量で添加される。次に、核が $1,000 \times g$ で10分間の遠心分離により除去され得る。後一核上清液が、0.5%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)及び10mMのEDTAを含む、TE(10mMのトリス、1mMのエチレンジアミンテトラ酢酸(EDTA)、pH7.5)飽和されたフェノール/クロロホルム(1:1)の等体積に添加される。上清液が4度再抽出され、そして $2,000 \times g$ で120分間の遠心分離により相分離される。RNAが、サンプルを0.25MのNaClに調整し、2体積の100%エタノールを添加し、そして $-20^{\circ}\text{C}$ で貯蔵することによって沈殿せしめられる。次に、RNAが $5,000 \times g$ で30分間、ペレット化され、70%及び100%のエタノールにより洗浄され、そして乾燥せしめられる。これは、合計の細胞質RNAを表わす。

他方、合計の細胞質RNAは、Chirgwinなど、1979, *Biochemistry*, 18:5294により記載されるようなグアニジニソチオシアネート塩化セシウム法を用いて単離され得る。

ポリアデニル化された(PolyA+)mRNAは、オリゴ(dT)セルロース上でのクロマトグラフィー処理により合計の細胞質RNAから得られる(J. Avivなど、1972, *PNAS*, 69: 1408~1412)。RNAが2mg/mlの濃度でETS(10mMのトリス、1mMのEDTA、0.5%のSDS、pH7.5)に溶解される。この溶液は $65^{\circ}\text{C}$ に5分間加熱され、次に $4^{\circ}\text{C}$ にすばやく急冷される。そのRNA溶液を室温にした後、それはNaClにより0.4Mに調整され、そして結合緩衝液(500mMのNaCl、10mMのトリス、1mMのEDTA、pH7.5)により前もって平衡化されたオリゴ(dT)

セルロースカラムにゆっくりと通される。その流動はカラムにさらに2度通され、そしてカラムは10体積の結合緩衝液により洗浄される。ポリ(A+)mRNAがETSのアリコートにより溶出され、TE-飽和フェノールクロロホルムにより1度抽出され、そしてNaClの添加により0.2Mにし、そして2体積の100%エタノールの添加により沈殿せしめられる。RNAを2度、再沈殿せしめ、乾燥の前、70%及び次に100%のエタノールにより1度洗浄される。次に、ポリ(A+)mRNAを用いて、cDNAライブラリーが構成され得る。

cDNAが、H. Okayama など、1983, *Mol. Cell Biol.*, 3:280(引用により本明細書に組込まれる)の方法を用いて、ポリA端のオリゴ(dT)プライミング及びAMV逆転写酵素を用いて富化されたmRNA画分から製造され得る。

cDNAライブラリーを調製するための他の方法は、もちろん当業界において良く知られている。1つの現在古い方法は、オリゴ(dT)プライマー、逆転写酵素、ポリ(dG)による二本鎖cDNAの末端化及び適切なベクター、たとえばpBR322又はその誘導体(所望する制限部位で切断され、そしてポリ(dC)により末端化されている)中へのアニーリングを用いる。この変法の詳細な記載は、たとえば1984年5月30日に公開されたEP第109,748号(引用により本明細書に組込まれる)に見出される。

I、BインヒビターをコードするcDNAクローンが同定され得る好ましい方法は、誘発された単球から得られるRNAを用いて生成されるcDNAを使用すること、及び誘発された、及び誘発されていない単球からのRNAを用いて生成されたcDNAプローブに特異的にハイブリダイズする個々のクローンを検出することである。誘発されているが、しかし未誘発されていない単球RNAから生成されたcDNAプローブに適切にハイブリダイズするクローンは、本発明のサイトカインイン

ヒビターをコードするcDNAを含むであろう。

cDNA挿入体は、既知の技法を用いて配列決定され得る。その好ましい技法は、適切なベクター中に挿入体をサブクローン化し(ここで典型的なベクターは、pGEMブルー(Promega Biotec, Madison, Wisconsin Corp.)である)、そしてSangerなど、1977, *PNAS(USA)*, 74:5463により記載されるジデオキシ鎖終結法を用いて二本鎖DNAを配列決定することである。配列決定は、市販されているキット、好ましくはUnited States Biochemical Co. Cleveland, Ohioにより製造されるSequenase配列決定キットを用いて、及び適切なプライマー、たとえばPromega Biotec, Madison, Wisconsinから得られるT7及びSP6及び配列特異的プライマーを用いて便利に行なわれる。

cDNA配列がI、Bをコードすることを確かめるために、ゲル移動度シフトアッセイが行なわれ得る。このアッセイは、NF- $\kappa$ BがI、Bの不在下で一定DNAに結合する観察に基づかれる。そのアッセイは、NF- $\kappa$ B〜クラスI MHCエンハンサー配列、すなわちTGGGGATTCCCA(配列番号2)の結合に対する、網状赤血球翻訳により生成されるI、Bの効果を検出することから成る。前に、このエンハンサー配列は、NF- $\kappa$ Bに結合することが示されている(Baldwin and Sharp, P., 1988 *PNAS(USA)*, 85:723~727)。アッセイにおけるNF- $\kappa$ Bの源は、種々の細胞タイプの核抽出物であり得るが、しかし好ましい源はマイトジェン及びホルボールエステル誘発されたJurkat T細胞である。この細胞系におけるNF- $\kappa$ Bの誘発は十分に記録されている(Nabel, G. and Baltimore, D., 1987, *Nature*, 326: 711~713)。

ゲル移動度シフトアッセイは、次の材料の適切な量をインキュベートすることによって行なわれる: I、B mRNAを有するか、又は有さない、Jurkat細胞及び/又はウサギ網状赤血球溶解物から得られ

た核抽出物及び適切なラベルされたMHCエンハンサー結合プローブ。その反応は、次のものの適切な量を含む緩衝液において行なわれる: 塩化ナトリウム、EDTA、DTT、ポリdI-dC(Pharmacia)及びグリセロール。その反応は好ましくは、室温で約15分間、行なわれ、そして次に、Baldwin, A., 1990, *DNA & Protein Eng. Tech.*, 2: 73~76により記載されるように、トリス/グリシン/EDTA緩衝液を用いて非変性5%ポリアクリルアミドゲル上での電気泳動にゆだねられる。ゲルは乾燥せしめられ、そして当業界において知られている技法を用いて一晩、オートラジオグラフ処理される。

上記ゲル移動度シフトアッセイを用いて、I、BをコードするcDNAクローンが、MHCエンハンサーDNA結合プローブへのNF- $\kappa$ Bの結合を排除するか又は減じるそれらの能力により同定され得る。

追加の試験が、cDNA配列がI、Bをコードし、そして種々のDNAエンハンサー結合タンパク質に非特異的に結合する分子をコードしないことを確かめるために行なわれ得る。それらの試験は、実質的に上記のようであるが、しかしNF- $\kappa$ Bのための異なったDNAエンハンサー配列及び/又は異なった転写レギュレーター置換を伴って、ゲル移動度シフトアッセイを用いて行なわれ得る。種々のそのようなタンパク質、たとえばKBF1、MLTF、Oct-1又はH2T1が試験された。

I、BをコードするDNA配列の知識が、当業界において知られている技法を用いて、生物学的システムにおいてI、Bの発現を測定するために使用され得るヌクレオチドプローブの合成を可能にすることは当業者に明らかであろう。これは、他方、I、Bの発現を誘発し、又は抑制する化学物質の同定を促進するであろう。そのような化学物質の同定は、医薬として価値を有するが、ところがI、B発現のレベルの決定は診断価値を有する。



次の例は本発明を例示するものであって、本発明の範囲を限定するものではない。

#### 例 1

##### 1. B のクローニング

1. B インヒビターをコードするcDNA配列を含むcDNAライブラリーを構成するための好ましい方法は、付着性単球から単離されたRNAからライブラリーを生成することである。これらの方法は、Sporn, S. A. など, *J. of Immunol.*, 1990, 144:4434 により記載されている。手短に言及すれば、出発材料は付着性単球から成る。単球は、ヒトから新たに又はAmerican Red Crossから得られる。両者の場合、単球は、初めに、当業界において知られているPicolli-Hypaque沈殿法により調製された単核細胞画分の形で、完全な血液から単離される。Boyun, A., 1968, *Scandinavian J. of Clinical Lab. Invest.*, 21:77。次に、単球を、Percollを用いて密度分別により単核画分から単離される。Ulmer, A. J., and Flod, D. H., 1979, *J. of Immunological Methods*, 30:1。他方、単球は、Eierman, D. F., など, 1989, *J. of Immunology*, 142:1970 により記載されるようにプラスチック組織培養皿上にそれらをプレートすることによって単離され得る。

単球を、Eierman, D. F., など, 1989, *J. Immunol.*, 142:1970 により一般的に記載されるようにして、組織培養プレート又はコラーゲン被覆組織培養プレート上に単球を接種することによって 1. B インヒビターを発現するために誘発する。種々の材料が、単球付着性をもたらす、そしてフィブロネクチンを含むように、組織培養プレートを被覆するために使用され得る。手短に言及すれば、100mmの組織培養プレートを、リン酸緩衝溶液 (PBS) 中、 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$  のヒトフィブロネクチンにより37℃で45分間、被覆する。過剰のフィブロネクチンをPBSによるプレートの洗浄により除去し、そして使用

きる。

上記単離された全体のRNAを、Watson and Jackson, 1985, *DNA Cloning*, 1:79, "A Practical Approach", (D. M. Glover, ed.), IRL Press, Oxford; 及びHuynh, et al., 1985, "Constructing and Screening Libraries in Lambda GT10 and Lambda GT11", *DNA Cloning*, 1:49, A Practical Approach, (D. M. Glover, ed.), IRL Press, Oxford により記載されるそれらの方法を用いてcDNAライブラリーの構成のために使用できる。この方法は、当業界において知られているように、AMV逆転写酵素及びクレノウフラグメントDNAポリメラーゼIを用いてのRNAの二本鎖cDNAへの転換を付与する。*EcoRI* リンカーを、二本鎖cDNAフラグメントに連結し、サイズ選択し、そして市販のパッケージ抽出物、すなわちGigapack (Stratagene, San Diego, CA) を用いて $\lambda$ gt10ベクター中にパッケージした。このライブラリーは、DNA  $1 \mu\text{g}$  当たり約  $7 \times 10^7$  の頻度で約  $5.3 \times 10^4$  個の組換え体を含んだ。

上記ライブラリーから、サブライブラリーを、誘発されなかった単球から得られたRNAを用いて製造された<sup>32</sup>P-ラベルされた第1-鎖cDNAプローブにハイブリダイズしない4,000個のクローンを選択することによって誘導した。

上記サブライブラリーを、30分間又は4時間、付着する単球から、又は調節された非付着性単球から単離されたRNAの逆転写により調製された<sup>32</sup>P-ラベルされた第1-鎖cDNAによる区別ハイブリダイゼーションによりスクリーンした。非付着性単球に比較して、付着された単球から製造されたcDNAプローブとのハイブリダイゼーションを示すそれらのブラックを、選択し、そしてプローブにより再スクリーンした。これは、1. Bの部分的配列を覆わず、350塩対フラグメントであるMAD-3の単離をもたらした。そのMAD-3配列

の前、プレートを空気に乾かす。単球をプレート上に接種し、そして全計のRNAがそれから抽出される前、少なくとも30分間、組織培養プレートに付着する。単球を、 $20 \mu\text{g}/\text{ml}$  のゲンタマイシンスルフェートを含むRPMI 1640培地において37℃で、95%空気/5%CO<sub>2</sub>の雰囲気下で培養する。一般的に約  $1 \sim 2 \times 10^7$  個の細胞が、100mmの皿当たりに接種される。

次に、付着性単球を、50gのPluka純粋種材料と0.5gのナトリウムN-ラウロイルサルコシン(最終濃度0.5%)、2.5mlの1Mクエン酸ナトリウム、pH7.0(25mM)及び0.7mlの2-メルカプトエタノール(0.1M)とを混合することによって前もって調製された、4Mのグアニジニウムチオシアネート溶液を含む溶液3.5mlを添加することによって、培養培地の除去の後、溶解する。その溶液を脱イオン水により100mlにし、そして濾過し、いつれかの不溶性材料を除去する。そのpHを、1MのNaOHにより7に調整した。

次に、単球RNAを、塩化セシウムの密度クラクションを通しての超遠心分離によりグアニジニウムチオシアネート均質物から分離する。技術種の塩化セシウムを5.7Mにし、そして0.1MのEDTA、pH7又は25mMの酢酸ナトリウム又はクエン酸ナトリウムにより緩衝する。その溶液を0.2%ジエチルピロカーボネートにより殺菌し、そして0.45 $\mu\text{m}$ のMilliporeフィルターを通して濾過する。次に、グアニジニウムチオシアネートにおける単球RNAを、塩化セシウムクラクションを通しての超遠心分離によりグアニジニウムチオシアネートから分離する。超遠心分離の後に形成するRNAペレットを、必要なら、水浴において68℃で少々加熱することによって、又はエタノールによりRNAペレットから過剰の塩化セシウムをまず抽出し、そして窒素により乾燥せしめることによって再溶解する。この態様で単離されるRNAを用いて、適切なcDNAライブラリーを調製することがで

は1. B cDNAの塩基783~1117とほぼ同一であるが、但し追加のトリプレット、TGAがMAD-3に存在することが異なる。MAD-3の配列は図1に示される。十分な長さの1. Bクローンを、付着された単球及び好中球から単離されたmRNAから製造された第2cDNAライブラリーをプローブするMAD3を用いて得た。mRNAを逆転写し、そしてcDNAをpcDNA1ベクター中にクローン化した。このベクターは、In Vitrogen Corporationから入手できる。このライブラリーのスクリーニングは、いくつかの十分な長さのクローンを生成し、そしてそれらの1つを配列決定した。

#### 例 2

##### 1. B のDNA 配列

cDNA挿入体を、二本鎖ベクターpGEM blue (Promega Biotec, Madison, WI) 中にサブクローン化した。dsc DNA配列決定を、Sequenase配列決定キット (United States Biochemical Co., Cleveland, OH) 及びT7及びSP6プライマー (Promega)並びに配列特異的オリゴヌクレオチドプライマーを用いることによって、ジデオキシ鎖終結法 (Sanger, F. S., など, 1977, *PNAS(USA)*, 74:5463 に記載されるようにして) により行なった。図2は、1. BのcDNA配列を示す。

1. Bの配列は、それが長さ約1550塩基対であり、そして翻訳の予測される出発部位のためにKozakコンセンサス配列の5'側の94個の塩基対を拡張することを示す。3'末翻訳領域は、mRNAの急速なターンオーバーに関与する3個のATTTA(配列番号3)特徴を示す (Kaput D., など, 1986, *PNAS(USA)*, 83:1670~1674)。ポリA端は、塩基対1550の端で始まる。

1. Bの推定されるアミノ酸配列が図2に示されており、そしてそれはcDNA配列に基づかれています。そのタンパク質は317個のアミノ

酸を有し、そして従って、34kDのおおよそ量を有する。その分子は、3種の明白なドメインを有することにおいて特徴づけられる。第1のN-末端ドメインは、チロシンリン酸化のためにコンセンサス配列、DEEYEQMK(配列番号4)を含む72個のアミノ酸の親水性範囲を示す。第2ドメイン、すなわちC-末端ドメインは、PKCリン酸化のためのコンセンサス配列、RPSTR(配列番号5)及びPEST(配列番号6)残基に富む領域を含み、このアミノ酸264~314は急速なタンパク質のターンオーバーに関連する。第3ドメインは、アンキリンコンセンサス配列の5個のタンデム反復体を含むアミノ酸74~242から成る(Lux S.E.など、1990, *Nature*, 344:36~42)。図3は、Kyte-Doolittle親水性/疎水性プロットを示す。5個のアンキリン反復体は上線が引かれており、そして個々の反復体は印が示されている。推定されるチロシンリン酸化ドメイン及び推定上のRKCキナーゼ標的配列がまた上線が引かれている。

### 例3

#### 1. B アッセイ

発現プラスミド、pcDNA1における1. B DNA配列が、SP6 RNAポリメラーゼを用いてRNAを生成するために使用された。RNAを、<sup>32</sup>S-メチオニンの存在下で、ウサギ網状赤血球溶解物において翻訳し、そしてその生成物を、10% SDSポリアクリルアミドゲル上で分析した。対照として、擬似翻訳された溶解物を用いて行なった。図4Aは、前記結果を示す。翻訳のために使用される網状赤血球溶解物は内因性NF- $\beta$ 様活性を含むので(データは示されていない)、その溶解物は、NF- $\beta$ に対して特異的なDNAアフィニティーマトリックスを用いてこの活性のために消耗された。それらのNF- $\beta$ 様消耗された網状赤血球溶解物は、クラスI MHCエンハンサー結合活性を実質的に示さなかった(図4B、レーン5を参照の

こと)。次に、その網状赤血球溶解物を、十分な長さの1. B mRNA、又はcDNAのAccI消化物に由来するmRNAのいずれかを翻訳するために使用し、又は擬似翻訳した。AccIは、第3アンキリン反復体におけるアミノ酸167に対応する位置で1. B cDNAを切断する。<sup>32</sup>S-メチオニンによりラベルされた、インビトロ翻訳された生成物を10% SDSポリアクリルアミドゲル上で電気泳動した。cDNAから予測されるように、十分な長さの1. B mRNA及びAccI消化されたプラスミドからのmRNAは、約36及び22kDのタンパク質を産出した(図4A、レーン1及び2)。

手短かに言及すれば、網状赤血球翻訳反応を、次の通りに行なった。十分な長さの1. B cDNAを含む2  $\mu$ gのpcDNA1を、BamHI又はAccIにより消化した。前記制限酵素は、cDNA挿入体の下流を切断する。反応消化物を、フェノール/クロロホルム抽出し、エタノール沈殿せしめ、そして製造業者(Boehringer Mannheim)により推奨される条件に従って、SP6 RNAポリメラーゼを用いて37°Cで1時間、100  $\mu$ lの反応においてRNAを合成するために使用した。得られるRNAを、フェノール/クロロホルムにより2度抽出し、エタノール沈殿し、そして20  $\mu$ lの水に再溶解した。RNAの合成を、アガロースゲルを用いての電気泳動により確めた。

しかしながら、翻訳反応を行なう前、ウサギ網状赤血球溶解物からまず、内因性NF- $\beta$ 様DNA-結合活性を消耗した。これは、脱イオン水により前もって洗浄されたDNAアフィニティ樹脂20  $\mu$ lに溶解物10  $\mu$ lを添加することによって行なわれた。結合反応は、室温で10分間、時々を混合を伴って行なわれた。混合物を、微小遠心分離管における短い間の遠心分離によりペレット化し、そして上清液をインビトロ翻訳反応のために除いた。次に、RNA 4  $\mu$ lを、Promega Biotechから得られたウサギ網状赤血球溶解物システ

ムにおけるインビトロ翻訳のために使用した。その反応を行なうための条件は、製造業者により推奨される条件であった。得られる<sup>32</sup>S-メチオニンラベルされた生成物を、Laemmli U. 1970, *Nature*, 227:680~685により記載されるようにして10% SDSポリアクリルアミドゲル上で分析した。ゲルを乾燥せしめ、そして標準方法を用いてオートラジオグラフィーのために感光した。

DNAアフィニティ樹脂は、臭化シアン活性化されたSephrose 4B(Sigma)に共有結合されたMHCクラスIエンハンサー配列TGGGGATTCCCCA(配列番号2)を含んだ。樹脂を製造し、そしてNF- $\beta$ の精製をKodonaga及びTjian(1986)の方法により実質的に行なった。PMA及びPHA刺激されたJurkat T細胞の核抽出物を、NF- $\beta$ 精製のために使用した。Jurkat核抽出物を20分間、樹脂と共にインキュベートし、そしてNF- $\beta$ を塩グラジエントにより分離した。たった1回のDNAアフィニティクロマトグラフィー処理を行なった。

1. B cDNA配列がNF- $\beta$ に結合する分子をコードすることを決定するために、ゲル移動度シフトアッセイを行なった。そのアッセイは、クラスI MHCエンハンサー配列、TGGGGATTCCCCA(配列番号2)の結合により示されるようにアクリルアミドゲル上でのNF- $\beta$ への網状赤血球翻訳により生成される1. Bの結合を検出することから成った。前で、このエンハンサー配列は、NF- $\beta$ に結合することを示された(Baldwin and Sharp, D., 1988, *PNAS(USA)*, 85:723~727)。アッセイにおけるNF- $\beta$ の源は、マイトジェン及びホルボールエステル誘発されたJurkat T細胞の核抽出物であった(下記に記載される)。この細胞系におけるNF- $\beta$ の誘発は十分に示されており(Nabel, G. and Baltimore, D., 1987, *Nature*, 326:711~713)、そしてさらに、KBPIに起因する性質を有する活性が存在する。

ゲル移動度シフトアッセイを、次の通りに行なった。Jurkat細胞から得られた核抽出物10  $\mu$ g及び又は、1. B mRNAを有するか又は有さないウサギ網状赤血球溶解物1  $\mu$ g、及び10,000計数/分のN-ラベルされたMHCエンハンサー結合プローブを、10mMのトリリス、pH7.7、50mMの塩化ナトリウム、0.5mMのEDTA、1mMのDTT、2  $\mu$ gのポリdI-dC(Pharmacia)及び10%のグリセロール(20  $\mu$ lの最終体積で)においてインキュベートした。反応を室温で15分間、行ない、そして次に、Baldwin, A., 1990, *DNA & Protein Eng. Tech.*, 2:73~76により記載されるようにして、トリリス/グリシン/EDTA緩衝液を用いて非変性5%ポリアクリルアミドゲル上での電気泳動にゆだねた。電気泳動は、20mAで約2時間、行なわれた。ゲルを乾燥せしめ、そして当業界において既知の方法を用いて-70°Cで一晩オートラジオグラフィー処理した。

図4において矢印により示されるDNA/タンパク質複合体は、種々の基準によりNF- $\beta$ 及びKBPIであると思われる。1. B プログラムされた溶解物の添加は、刺激されたJurkat T核抽出物における遅いNF- $\beta$ /DNA複合体(図4B、レーン2において大きな矢印により示される)に関連するDNA結合活性を阻害し、そして早く移動するKBPI/DNA複合体(図4B、レーン2において小さな矢印により示される)に関連する因子に単に弱く影響した。欠失されたmRNAによりプログラムされた溶解物又は擬似翻訳された溶解物のいずれかの添加は、DNA-結合活性に影響を及ぼさなかった(図4B、レーン3及び4)。

PMA及びPHA刺激されたJurkat細胞の核抽出物におけるDNA-結合活性をさらに特徴づけるために、いくつかのアッセイを行なった。本発明者は最初に、矢印により同定される2種の活性は、それらが2点変異誘発されたプローブと相互反応しないので、MHCエンハン

サブローブに対して特異的であることを示した(図4C、レーン1)。本発明者は、この変異ブローブTGGGATTCCCGA(配列番号7)がNF- $\kappa$ Bにより結合されないことをこれまで示した(Baldwin and Sharp, 1988, 前記)。遅い及び早い複合体に関連する因子は、NF- $\kappa$ B及びKBFIであるそれらの活性と調和した、免疫グロブリンカッパ及びクラスI MHCエンハンサーブローブ(図4C、レーン2及び3)と十分に同等に相互反応する。最後に、2種のDNA/タンパク質複合体は、NF- $\kappa$ Bのp50サブユニットに対する抗体により認識されるが(図4C、レーン4)、しかしプレー免疫血清によっては認識されない(図4C、レーン5)。従って、I, Bタンパク質は、刺激されたJurkat T細胞からの真のNF- $\kappa$ B活性を強く阻害し、そしてJurkat KBFI活性をひじょうに弱く阻害することができる。

核抽出物を、Swick など, 1989, *Nucleic Acids Res.*, 17:9291~9304の方法を用いて、Jurkat T細胞から調製した。細胞を、10%ウシ胎児血清を含むRPMI1640培地において増殖した。所望により、細胞を、植物凝集系(PHA)及びホルボール12-ミリステート13-アセテート(RMA)により刺激した。それらは、それぞれ1  $\mu$ g/ml及び50ng/mlの最終濃度で使用された。

観察された阻害がNF- $\kappa$ B活性に対して特異的であることを示すために、本発明者は、他の特徴づけられたDNA-結合タンパク質に対するI, Bタンパク質の影響を分析した(図5A)。I, Bは、主な後期転写因子(Carthew など, 1985, *Cell*, 43:439~448; USFとしても知られる)、Oct-1因子(Singh, など, 1986, *Nature*, 319:154~158)、又はH2TF1、クラスI MHCエンハンサー結合因子(Baldwin and Sharp, 1987)のDNA-結合活性を阻害しなかった。本発明者は次に、他の細胞源からのNF- $\kappa$ Bが翻訳されたI, Bタ

ンパク質により阻害されるかどうかを分析した。新たに単離された単球の核抽出物からのNF- $\kappa$ Bは、I, Bタンパク質により阻害されたが、しかしそれらの細胞に見出されるKBFI活性は影響されなかった(図5B)。それらの抽出物におけるNF- $\kappa$ B及びKBFI活性の両者は、p50 NF- $\kappa$ Bサブユニットに対する抗体により認識される。従って、I, Bタンパク質は、いくつかの細胞源からのNF- $\kappa$ Bに対してひじょうに特異的であり、そしてKBFI DNA結合活性に対してほとんど又はまったく影響を与えなかった(図4B及び5B)。それらの結果は、I, BがKBFIには不在である、NF- $\kappa$ Bの65kDのサブユニットと相互作用する観察と調和する(Kieran など, 1990, *Cell*, 62: 1007~1018)。従って、本発明者は、I, B翻訳生成物がNF- $\kappa$ B DNA-結合活性を特異的に阻害し、そしてKBFI, MLTF', Oct-1又はH2TF1のDNA-結合活性を阻害しないことを決定する。

DNA-結合ブローブは、BamHI制限端を有するポリリンカー中にクローン化されたオリゴヌクレオチドを含むpUCプラスミドのラベルされたHindIII-EcoRI消化物である。クラスI MHCエンハンサーブローブの配列は、GGCTGGGGATTCCCATCT(配列番号8)であり、そして変異MHCブローブはGGCTGCGGATTCCCATCT(配列番号9)であり(Baldwin and Sharp, 1987)、MLTFブローブの配列はACCCGGTCACGTGGCCTACA(配列番号10)であり、Oct-1ブローブの配列はATGCAAAAT(配列番号11)であり、そして免疫グロブリンカッパブローブの配列はCAGAGGGACTTTCCGAGA(配列番号12)である。

従って、上記に示された実験に基づけば、I, BをコードするcDNA配列がIF-KB DNA結合活性を特異的に阻害するタンパク質を生成し、そしてKBFI, MLTF, Oct-1又はH2TF1に関連する活性を阻害しないことが結論づけられる。

I, Bのもう一つの特徴は、それがナトリウムデオキシコレート

(DOC)によりNF- $\kappa$ Bから開放され得ることである。I, BがNF- $\kappa$ Bから開放されれば、NF- $\kappa$ BはDNAに結合できる。従って、I, Bをさらに特徴づけるために、本発明者は、I, B mRNAによりプログラムされた網状赤血球溶解物をナトリウムデオキシコレートにより処理し、そしてNP40及び前記処理された混合物を、前記のようにして、ゲル移動度シフトアッセイにおいて試験した。内因性NF- $\kappa$ Bを、上記のようにしてDNAアフィニティークロマトグラフィー処理により除去し、内因性NF- $\kappa$ B/I, B複合体を除去した。刺激されたJurkat T細胞の根核抽出物に類似する(図4B)、I, B翻訳生成物は、この一部精製されたNF- $\kappa$ Bを阻害する(図6、レーン2)。

より特定には、NF- $\kappa$ Bを含む10  $\mu$ gの核抽出物を、1  $\mu$ gのI, Bプログラムされた溶解物又は疑似翻訳された溶解物と上記結合条件下で反応せしめた。その反応は室温で10分間維持され、続いて、2  $\mu$ gのポリdI-dC及び10,000cpmの放射性ラベルされたDNAブローブを添加した。次に、反応物は、5%ポリアクリルアミドトリス/グリシン/EDTAゲル上に負荷され、そして上記のようにして分析された。解離反応のためには、0.8%のナトリウムデオキシコレートを、結合反応に添加し(ポリdI-dC及びブローブ)、続いて1.2%NP40を添加した。ポリdI-dC及びブローブを添加し、そして室温で15分間、インキュベートした。これらの反応物を電気泳動し、そして上記のようにして分析した。ナトリウムデオキシコレート(DOC)とのNF- $\kappa$ B/I, B反応、続く、NP40インキュベーションの処理は、NF- $\kappa$ B DNA-結合活性を開放した(図6、レーン3)。従って、反応からのNF- $\kappa$ B DNA-結合活性の開放は、抽出物におけるNF- $\kappa$ B/I, B複合体に由来し、そしていずれかの内因性NF- $\kappa$ B/I, Bには由来しない。NF- $\kappa$ B DNA-結合活性は

DOC処理により、実施されたNF- $\kappa$ B/I, Bから回収され得るので、本発明者は、I, BがI, Bの性質を有するタンパク質をコードすることを結論づける。

#### 例4

##### I, Bの組織分布

種々の組織/細胞における本発明のI, Bインヒビターの存在を、ノーザンブロット分析又はPCRを用いて決定した。

ノーザンブロット分析は、上記のようにHaskill など, により記載されているように、ゲアニジンイソチオシアネート塩化セシウム法を用いて、処理される組織から合計のRNAを単離することから成った。フィルターを43°Cでハイブリダイズし、そしてブローブとしてI, Bを用いて、56°Cで、0.2 $\times$ SSCの最終洗浄まで洗浄した。PCR分析は、上記のようにして単離された合計のRNA 1  $\mu$ gを用いて行なわれ、それによってRNAが、Kawasaki など, 1989, *Detection of Gene Expression, PCR Technology*(Englich出版)、H.A.(Stockton, New York)、89~97ページに記載されているようにして、ランダムヘキサマーを用いて第1鎖DNAに転換された。次に、増幅が5'-TCGTCGCGCCATGTTCCAG(配列番号13)及び3'アンチセンスプライマー-GCGGATCACTTCCATGGTCAG(配列番号14)(塩基対359-379)により行なわれた。転写頻度が1つの組織タイプから他の組織タイプに比較され得るように、用量応答曲線を、試験サンプルとして、同じPCRサイクル番号で決定した。対照は種々の希釈度でI, B cDNA、並びにI, B発現を誘発する下層に4時間、付着した単球から単離されたRNAを含んだ。NF- $\kappa$ Bプライマーを、Kieran など, 1990, *Cell*, 62: 1007~1018の公開された配列を用いて合成した。そのセンスプライマーは、TAGAGCAACCTAAACAG(配列番号15)(塩基対316-335)であり、そしてアンチセンスプライマーは、TCATTCTGTC

TTCCAGTGT(配列番号16)(塩基対629-648)で。

図7Aは、I、Bが新しいPercoll-単離された単球(To)には見出されないが、しかしタイプIVコラーゲンへの結合により誘発されることを示す。

ノーザン分析は、I、Bが異なった支持体に付着する単球及び血液好中球に高く発現され、そしてまた、子宮内膜症に関連する腹膜炎炎症性マクロファージにも存在することを示した。それらの結果は、図7Bに示される。

PCR分析は、試験された多くのサンプルにI、B mRNAの構成的発現を示した(図7C)。これは、HSB及びRAJI細胞、グリオブラストーマ細胞、G82及びHUV細胞を包含した。I、Bの量は、LPSによるHUV細胞の活性化により高められ、I、B発現における約9倍の上昇を引き起こした。HUV細胞の付着は、発現の80倍の上昇を引き起こした。NP-、Bの発現がまた、To及び4時間のプラスチック-付着性単球のためにも示される。I、Bはまた、いくつかの骨髓腫細胞系に存在することが観察され、そして発現のレベルはPMAへの暴露により2~3倍高められたが、IL-2又はTNFへの暴露の後には、ほとんど又はまったく上昇は観察されなかった(示されていない)。

#### 例5

##### 医薬の同定

I、Bは、遺伝子発現を高め又は阻害する医薬を同定するために適切なアッセイ型に使用され得る。精製された組換え又は天然に存在するI、Bは、I、B / NP-、B複合体形成の形成を阻害し、又はいったん形成された複合体を安定化する化学物質を同定するためにNP-、Bと組合して使用され得る。他方、I、Bのインビトロ転写及び翻訳は、下記のようにして用いられ得る。それらの方法を実

施するための材料及び方法上に記載されており、そして引用により本明細書に組込まれる。

複合体形成を阻害し又は妨げる化学物質は、適切なDNA配列に結合する遊離NP-、Bの量を高めることによって遺伝子発現を増強するが、ところが複合体を安定化する化学物質は利用できる遊離NP-、Bの量を調節することによって遺伝子発現を妨げ又は遅くする。

たとえば、複合体形成を阻害する化学物質を同定するために、発現プラスミド、pcDNA1におけるI、B DNA配列が、SP6 RNAポリメラーゼを用いてRNAを生成するために使用され得る。RNAは<sup>32</sup>S-メチオニンの存在下でウサギ網状赤血球溶解物混合物において翻訳され、そして化学物質の存在又は不在下でのNP-、Bと組合されるアリコートが阻害活性のために試験される。NP-、Bの源は、上記のようにして調製される刺激されたJurkat T-細胞である。次に、反応生成物を、ゲル移動度シフトアッセイにおいて分析した。複合体形成を阻害する化学物質は、対照に比較した、ゲルアッセイにおいてほとんど又はまったくシフトを生成しなかった。

I、B / NP-、B複合体を安定化する化学物質を同定するために、化学物質を、デオキシコレートの存在下で複合体を維持するそれらの能力について試験することができる。デオキシコレート/NP40におけるI、B / NP-、B複合体を解離するためのアッセイは例3に記載されており、そして本発明のアッセイは同様にして行なわれたが、しかし化学物質の添加が、ゲルシフトアッセイの前に試験された。複合体を安定化する化学物質はNP-、BからのI、B解離を妨げ、そしてこれは放射性ラベルされたMHCクラスIエンハンサーローブへのNP-、Bの減じられた結合により検出される。

いずれか類似する又は同等の方法及び材料が本発明の実施又は試

験において使用され得るが、好ましい方法及び材料が現在、記載されている。前記例は本発明を例示するものであって、本発明の範囲を限定するものではない。

本発明は、特定の態様により記載されて来た。しかしながら、本出願は、本発明の範囲内で、当業者による変更及び修飾を行なえる。

生物学的材料の寄託: I、Bをコードする次のプラスミドは、American Type Culture Collectionに寄託されている。

命 名	ATCC No	寄託日
E. コリ宿主DH5		5-16-91
におけるpC3.A		

```

1  ctgaccctgggt gtcactctctg ttgaagtgtg gggctgatgt caacagagtt
51  acctaccagg gctattctcc ctaccagctc acctggggcc gcccaagcac
101  ccggatcacg cagcagctgg gccagctgac actagaaac cttagatgc
151  tgccagagag tgaggatgag gagagctatg acacagagtc agagttcagg
201  gagttcacag aggacgagct gccctatgat gatcactgtg tgtttggagg
251  ccaggctctg acgttatgag caaaggggct gaaagaacat ggaacttgcac
301  atttgtaaaa aaaaaaagt tttattttc taataaaaaa aaaaaaaa

```

FIG. 1

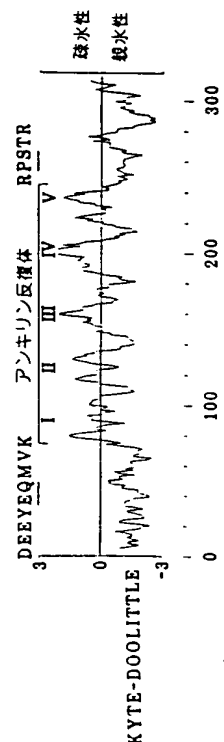
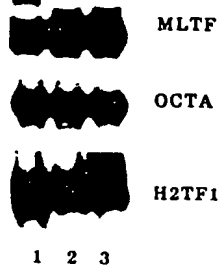


FIG. 3



網狀赤血球： - WT MT



**FIG. 5A**

網狀赤血球： - MT WT



FIG. 5B








To		To
30'		コラーゲン
1h		プラスチック
2h		フィブロネクチン
4h		フィブロネクチン
8h		抗-フィブロネクチン
24h		子宮内膜炎
		PMN

FIG. 7A

FIG. 7B

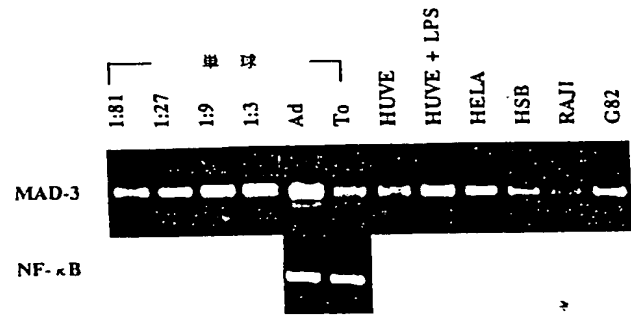


FIG. 7C

## 國際調查報告

PCT/US 92/04073

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (In several applications systems apply, indicate only) According to International Patent Classification (IPC) or to the Patent Classification and IPC			
Int.Cl. 5	C12N15/12; C12N1/21	C12N15/85; C07K13/00;	C12Q1/68
B. FIELDS SEARCHED			
Classification System		Classification System	
Int.Cl. 5	C12N ;	C07K ;	C12Q
Documents Searched other than Minimum Documentation re (a) Least that such Documents are included in the Field Searched			
13. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT*			
Category *	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passage(s)		Submitted to Class No. 5
X	WO, A 8 908 147 (WHITEHEAD INSTITUTE FOR BIOCHEMICAL RESEARCH) 8 September 1989 " see the whole document especially the claims "		10, 12-17
P, X	CELL. vol. 65, 28 June 1991, CAMBRIDGE, MA US pages 1281 - 1289; S. HASKILL ET AL: 'Characterization of an immediate early gene induced in adherent monocytes that encodes iκB-like activity' see the whole document		1-17
X	NATURE. vol. 344, 12 April 1990, LONDON GB pages 678 - 682; S. GHOSH ET AL: 'Activation in vitro of NF-κB by phosphorylation of its inhibitor iκB' cited in the application see the whole document		1-4, 6-12, 14, 16
	---		
	-/-		
<p>* "Source" designation of the general class of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"A" designation of the general class of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"T" specific citation has been made as to what the International filing date</p> <p>"L" document which may derive from a priority claim or which is used to indicate the publication date of another citation or other source (not specified)</p> <p>"C" document containing a full and complete, new, addition or other source</p> <p>"P" document published or prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"I" text documents published after the international filing date at priority date but not in conflict with the above and not in conflict with the above</p> <p>"E" text documents published after the international filing date at priority date but not in conflict with the above and not in conflict with the above</p> <p>"S" document of particular relevance, the relevant portion is considered to be relevant to the art as a whole</p> <p>"B" document of particular relevance, the relevant portion is considered to be relevant to the art as a whole</p> <p>"G" document of particular relevance, the relevant portion is considered to be relevant to the art as a whole</p> <p>"H" document of particular relevance, the relevant portion is considered to be relevant to the art as a whole</p> <p>"I" document of particular relevance, the relevant portion is considered to be relevant to the art as a whole</p> <p>"J" document of particular relevance, the relevant portion is considered to be relevant to the art as a whole</p> <p>"K" document of particular relevance, the relevant portion is considered to be relevant to the art as a whole</p> <p>"L" document of particular relevance, the relevant portion is considered to be relevant to the art as a whole</p> <p>"M" document of particular relevance, the relevant portion is considered to be relevant to the art as a whole</p> <p>"N" document of particular relevance, the relevant portion is considered to be relevant to the art as a whole</p> <p>"O" document of particular relevance, the relevant portion is considered to be relevant to the art as a whole</p> <p>"P" document of particular relevance, the relevant portion is considered to be relevant to the art as a whole</p> <p>"Q" document of particular relevance, the relevant portion is considered to be relevant to the art as a whole</p> <p>"R" document of particular relevance, the relevant portion is considered to be relevant to the art as a whole</p> <p>"S" document of particular relevance, the relevant portion is considered to be relevant to the art as a whole</p> <p>"T" document of particular relevance, the relevant portion is considered to be relevant to the art as a whole</p> <p>"U" document of particular relevance, the relevant portion is considered to be relevant to the art as a whole</p> <p>"V" document of particular relevance, the relevant portion is considered to be relevant to the art as a whole</p> <p>"W" document of particular relevance, the relevant portion is considered to be relevant to the art as a whole</p> <p>"X" document of particular relevance, the relevant portion is considered to be relevant to the art as a whole</p> <p>"Y" document of particular relevance, the relevant portion is considered to be relevant to the art as a whole</p> <p>"Z" document of particular relevance, the relevant portion is considered to be relevant to the art as a whole</p>			
14. CERTIFICATION			
Date of the actual Submission of the International Search		Date of Mailing of this International Search Report	
11 SEPTEMBER 1992		18. 09. 92	
International Searching Agency		Signature of Authorised Official	
EUROPEAN PATENT OFFICE		LE CORNEC N.O.R.	

Page 7 of 10

PCT/US 92/04073

ALL DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)		
Category *	Character of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Reference to Class No.
X	<p>CELL. vol. 61, April 1990, CAMBRIDGE, MA US pages 255 - 265; U. ZABEL ET AL: 'Purified human IκB can rapidly dissociate the complex of the NF-κB transcription factor with its cognate DNA' cited in the application see the whole document</p> <p>---</p>	1-12, 14, 16
X	<p>CELL. vol. 53, 22 April 1988, CAMBRIDGE, MA US pages 211 - 217; P. A. BAEVERLE ET AL: 'Activation of DNA-binding activity in an apparently cytoplasmic precursor of the NF-κB transcription factor' cited in the application see the whole document</p> <p>---</p>	10, 12-17

From 6/27/2014 to 6/28/2014, the following information was reported:

## 国際調査報告

International application No.  
PLT/US 92/04073

## 国際調査報告

US 9204073  
SA 60775

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2c) for the following reasons:

1. ☒ **Claims Not:**  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Although claims 14 and 15 are directed to a method of treatment of the animal body the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound.
2. ☐ **Claims Not:**  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ **Claims Not:**  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 4 A(c).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This international searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, the Authority did not seek payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the inventions first mentioned in the claims; a is covered by claim Nos.:

Remark on Prior Art

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's present.
- ☐ No present accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (recommendations of first sheet (1)) (July 1992)

This report sets the official family numbers relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The numbers are as contained in the European Patent Office EDP file on The European Patent Office is to be very useful for those particulars which are merely given for the purpose of information. 11/09/92

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-8908147	08-09-89	EP-A- 0407411	16-01-91

EPO FORM 800

For more details about this report: see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/92

## フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>5</sup>

識別記号

庁内整理番号

F I

C 1 2 P 21/02

C 8214-4B

C 1 2 Q 1/68

A 7823-4B

G 0 1 N 33/15

Z 7055-2 J

// (C 1 2 N 1/21

C 1 2 R 1:19)

(C 1 2 P 21/02

C 1 2 R 1:19)

(72) 発明者 バルドウィン, アルバート エス., ジュニア  
アメリカ合衆国, ノースカロライナ  
27514, チャペル ヒル, ホールド ミル  
ロード 782

(72) 発明者 ラルフ, ビーター  
アメリカ合衆国, カリフォルニア 94563,  
オリнда, クレスト ビュー ドライブ  
119

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS

☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☐ FADED TEXT OR DRAWING

☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**